

## 学位論文

### 免疫抑制剤サイクロスポリンAがラット骨代謝に及ぼす影響

和田 智恵

キーワード：サイクロスポリン A, 骨吸収, マイクロ CT, 骨形態計測, 骨基質蛋白

### Effect of Cyclosporin A on Bone Metabolism in Rat Long Bone.

Chie WADA

**Abstract :** Cyclosporin A (CsA) is used as an immunosuppressive agent and its one of prominent side effects is an induction of osteoporosis. The purpose of this study was to investigate the effect of CsA on bone metabolism to elucidate the mechanisms of CsA-induced osteoporosis. Fifteen-day-old rats were fed a powdered-diet containing or lacking CsA for 8 to 30 days. On days 8, 16 and 30, tibiae, bone marrows, and plasma were collected for morphological and biochemical assays. During experimental periods, there was no influence of CsA on the full length of tibia and body weight. Three dimensional micro CT analysis revealed that the three dimensional trabecular bone volume of proximal tibia treated with CsA was not changed on day 8 but it was decreased on days 16 and 30 showing osteoporotic bone resorption. Histological analysis from decalcified section revealed that the volume of bone was decreased by CsA on days 16 and 30 whereas no change on day 8. On day 16, the number of osteoclasts and osteoblasts in CsA-treated rats were significantly increased than that in the controls. Plasma calcium level was normally maintained during experimental periods in both groups. Plasma parathyroid hormone (PTH) and osteocalcin (OCN) levels in CsA-treated rats were increased on day 8 and the levels were decreased to the control levels on days 16 and 30. Northern blot analysis using bone marrow cells revealed that the CsA-treated group showed the increased mRNA levels of OCN, OPN, and cathepsin K on day 8. On day 16, no significant differences of these mRNA levels were observed between CsA-treated and the control groups. The elevation of the parameters on day 8 may possibly reflect the functional increase of bone metabolism in rat long bones, followed by the appearance of bone resorption on day 16. These findings suggest that bone resorption observed in CsA-treated rats is a result of high turnover of bone metabolism and that the active bone remodeling may be induced by the elevation of plasma PTH.

### 緒 言

サイクロスポリン A (CsA) は、11残基のアミノ酸からなる環状ポリペプチドであり、1976年にノルウェーの土壌中の真菌から発見された<sup>1)</sup>。CsA は免疫抑制作用を有し、臓器移植後の拒絶反応の抑制や自己免疫疾患の治療などに広く臨床応用されている。しかし、CsA は腎障害、肝障害、骨粗鬆症などの副作用を有することも知ら

れており<sup>2-4)</sup>、口腔内の副作用としては歯肉増殖症が挙げられる<sup>5,6)</sup>。また、臓器移植後に CsA を服用している患者は著しい骨量減少が生じ、骨折率が増加するとの報告がある<sup>3,4,7-9)</sup>。

CsA 誘発性骨吸収の病態を臨床的に把握することは難しい。なぜなら、臓器移植後、患者の大多数は CsA と同時にグルココルチコイドのような他の免疫抑制剤も

投与されており、とくにグルコルチコイドは重篤な骨吸収を引き起こすなど骨代謝に強い影響を与える作用があるからである。一般に、グルコルチコイドはヒトとラットにおいてオステオカルシン (OCN) の合成を阻害し<sup>10-12)</sup>、グルコルチコイド単独投与患者では血清 OCN 濃度は減少する。しかしながら、CsA と併用された場合には腎臓<sup>13)</sup>、心臓<sup>14)</sup>、肝臓<sup>15)</sup> の移植症例で OCN 濃度は上昇することが報告されており、グルコルチコイドと CsA の共存下での骨反応の正確な実態を把握することも難しいのが現状である。CsA の登場により、グルコルチコイド投与量の減少が可能になったが<sup>3, 4)</sup>、依然として多くの移植患者に骨粗鬆症が認められる原因として、CsA の骨作用が影響しているものと考えられる。また、グルコルチコイドや CsA に対する個人の薬物代謝能力の差 (血中濃度の差) や、骨に対する反応性に個人差があることも薬物誘発性骨粗鬆症の病態把握を困難にしている原因の一つであると考えられる。

CsA の骨に対する影響を調べた研究は多く報告されている。Stewart ら<sup>16)</sup> は副甲状腺ホルモン (PTH), 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] およびプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) で刺激して破骨細胞の機能を誘導する *in vitro* のモデルにおいて、CsA が破骨細胞の骨吸収活性を抑制することを報告し、Movsowitz ら<sup>17)</sup> は *in vivo* のモデルにおいて CsA がラット海綿骨に重篤な骨吸収を引き起こすことを報告している。一方、Orcel ら<sup>18)</sup> は CsA 投与により椎体では骨吸収の抑制が生じたことを、Klein ら<sup>19)</sup> は、CsA による骨吸収に、部位による影響は認められなかったことを報告している。このように報告によって相反する結果が得られている点については、各実験における薬剤の投与量や投与期間、性別、ラットの週齢等の相違が関連しているとも考えられる。いずれにせよ、CsA 投与により発症する骨吸収のメカニズムについては、十分な情報が得られていないのが現状であり、CsA 単独による骨への作用を改めて検討する必要がある。

口腔内に視点をみると、CsA は線維性の肥厚を伴う歯肉増殖症を引き起こしプラークコントロールが困難になり、う蝕や歯周病が誘発されやすくなるとともに、顎骨や歯槽骨においては CsA 誘発性骨粗鬆症を引き起こす可能性が考えられる。骨粗鬆症患者はアタッチメントロスが大きく、歯周病のリスクファクターとなり得る可能性がある<sup>20)</sup>と指摘されている。骨粗鬆症患者の大半は閉経後のエストロゲン欠乏による女性であるが、CsA も骨粗鬆症発症の一因子として顎骨や歯槽骨の代謝に影響しているとすれば、CsA 服用が歯周病のリスクを上昇させる可能性も考えられる。

当研究室では CsA 誘発性ラット歯肉増殖症の実験系を有している<sup>21)</sup>。このラットモデルではヒトと同様に肉眼的に識別可能な線維性歯肉増殖を再現することができる。本研究では、この実験系を適用して CsA のラット

脛骨骨代謝へ及ぼす影響をマイクロフォーカス X 線 CT 装置 ( $\mu$ CT) によって解析することとした。 $\mu$ CT は、非破壊的に実験動物の骨を約 10  $\mu$ m 単位の分解能でデータ処理し 3 次元画像として構築することが可能で、骨梁の微細構造を分析できる装置として近年開発された画像解析装置である。本研究では、さらにラット脛骨の脱灰薄切組織切片を作製し、海綿骨骨梁表面上の破骨細胞と骨芽細胞の数について骨形態計測を行うとともに、骨代謝関連指標である血漿 PTH 濃度および OCN 濃度に及ぼす CsA の影響も検討した。一方、CsA 投与後の大腿骨骨髓細胞における骨代謝関連蛋白 OCN、オステオポンチン (OPN)、および骨代謝関連酵素カテプシン K の mRNA 発現変化についてノーザンブロット分析を行った。以上に示したラット長管骨の形態および機能分析を通じて CsA の骨代謝に及ぼす影響を検索した。

## 材料ならびに方法

### 1. 動物および試料

実験動物として 15 日齢雄性 Fischer 344 ラット (日本チャールズ・リバー、大阪) 80 匹を用い、そのうち 30 匹は 3 次元骨梁構造解析および骨形態計測に、30 匹は血液生化学分析に、20 匹はノーザンブロット分析に使用した。CsA は Novartis Pharma AG 社 (Basel, Switzerland) より供与された。ラットの飼育および試料については、CsA 投与群は、飼育開始後 10 日間は CsA 量 50 mg/kg となるように調製した粉末飼料ダイエツト No.2000 (日本クレア、大阪) にて飼育し、その後は CsA 濃度 200 mg/kg に調製したものを与えた<sup>21)</sup>。対照群はダイエツト No.2000 のみで飼育し、飼育開始後 8, 16, 30 日目にエーテルおよびネプタールを用いてラットを安楽死させ、CsA 投与群および対照群ラットの脛骨、大腿骨骨髓、血液をそれぞれ採取した。

### 2. $\mu$ CT による 3 次元骨梁構造解析

飼育開始後 8, 16, 30 日目の CsA 投与群および対照群ラット 30 匹 (各群 15 匹: 5 匹  $\times$  3 実験日) より右側脛骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒド (ナカライテスク、京都) にて固定を行った。次いで 7  $\mu$ m の焦点を有する  $\mu$ CT (Model MIF-100; 日立メデイコ、東京) を用いて、脛骨近心部の断層撮影を行った。得られた 2 次元画像は、画像解析ソフト (TRI/3D-BON; ラトックシステムエンジニアリング、東京) を用いて、ボクセルサイズ 14  $\mu$ m、解像度 1280  $\times$  1024 画素にて 3 次元画像として再構築した。脛骨の長径は 2 次元画像上で測定した。3 次元骨梁構造解析に際し、脛骨の近心端より 2.5 mm の位置を基準点 (起点) とし、5.3 mm の位置まで 14  $\mu$ m の等間隔幅で、合計 201 枚の断層撮影を行った。撮影条件は、骨と軟組織との間に良好なコントラストを得るために 50 kV, 100  $\mu$ A に設定した。パラメーターとして組織あたりの海綿骨量: Bone volume/Tissue volume [BV/TV

(3D)], 骨梁幅: Trabecular Thickness (Tb. Th), 骨梁間隙: Trabecular Separation (Tb. Sp) を用いた。

### 3. 脱灰組織切片を用いた骨形態計測

飼育開始後 8, 16, 30 日目の CsA 投与群および対照群ラット 30 匹 (各群 15 匹: 5 匹 × 3 実験日) より左側脛骨を摘出し、軟組織の除去後、4% パラフォルムアルデヒドで固定を行った。次いで、中性 EDTA 10% 溶液にて低温 (4℃) で 20 日間の脱灰操作を行った後、エタノール脱水を順次行い、パラフィンに包埋した。引き続き、ロータリーミクロトーム (Model HM 360; MICROM INTERNATIONAL GmbH, Walldorf, Germany) を用いて 7 μm 厚さの脱灰薄切切片を作製した後、破骨細胞を観察するために酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い、さらにマイヤーのヘマトキシリンで対比染色を施し、光学顕微鏡 (Microphoto V series; VFD, Nikon, 東京) 下で観察した。計測範囲は脛骨近心部の二次海綿骨、すなわち成長板より遠位 1.2 mm から 2.0 mm の間の皮質骨を含まない部分とした。破骨細胞については、骨梁表面に存在する TRAP 陽性の多核細胞の数を計測し、骨芽細胞については、骨梁表面に配列する立方状の細胞数を計測した。次いで、Seto らの方法<sup>22)</sup> に準じて組織あたりの海綿骨量: Bone volume/Tissue volume [BV/TV (2D)], 単位骨梁表面長さあたりの破骨細胞数: Number of Osteoclast/Bone Surface (N. Oc/BS), および骨芽細胞数: Number of Osteoblast/Bone Surface (N. Ob/BS) を算出した。

### 4. 血液生化学分析

飼育開始後 8, 16, 30 日目の CsA 投与群および対照群ラット 30 匹 (各群 15 匹: 5 匹 × 3 実験日) にネンブター麻酔を施し腹部大動脈より血液を採取した。血液は採血管 (ヘパリン/血漿分離剤入り) 中に十分に振盪させた後 3000 rpm で 20 分間遠心し、血漿を回収した。血漿カルシウム濃度はメチルキシレノールブルー法 (MXB 法) に基づいたキット (カルシウム E-テストワコー; 和光純薬工業, 大阪) を用いて測定した。すなわち、キット付属の緩衝液 1000 μl に対して血漿サンプルを 50 μl 加えて十分に混合した後、MXB を含む発色試薬を 500 μl 添加して発色させ、610 nm にて吸光度を測定した。血漿 PTH 濃度、血漿 OCN 濃度は、ELISA 法に基づいたキット (BIOTRAK アッセイシステムシリーズキット; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) を用いて測定した。血漿 OCN 濃度の測定では、抗ラット Gla-OCN 抗体コーティングプレートにサンプルを 100 μl 加えて、室温で 1 時間反応させ、付属の洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した後、HRP 標識抗ラット OCN 抗体溶液を 100 μl 加えて、室温で 1 時間反応させた。3 回洗浄後、テトラメチルベンゼンと過酸化水素水からなる基質溶液 (TMB 基質) を 100 μl 加えて室温で 15 分間反応させ 1 N 硫酸で

反応を停止させ、450 nm にて吸光度を測定した。血漿 PTH 濃度の測定では、抗ラット PTH 抗体コーティングプレートに plate reagent を 50 μl 加えた後、サンプルを 100 μl 加えて、室温で 2 時間反応させた。付属の洗浄用緩衝液で 5 回洗浄後、ビオチン標識抗ラット PTH 抗体溶液を 100 μl 加え、室温で 1 時間反応させた。5 回洗浄後、キット付属の西洋ワサビペルオキシダーゼとストレプトアビジンの結合体からなる AMDEX™ を 100 μl 加え、30 分間反応させた。5 回洗浄後、TMB 基質を 100 μl 加えて室温で 30 分間反応させ、0.2 M 硫酸で反応を停止させた後、450 nm にて吸光度を測定した。

### 5. ノーザンブロット分析

大腿骨骨髓細胞における骨代謝関連蛋白の mRNA 発現を調べるために、ノーザンブロット分析を行った。骨形成系の指標として骨基質蛋白である OCN と OPN を、骨吸収系の指標として骨吸収時に誘導される蛋白分解酵素カテプシン K を用い、それぞれの mRNA 発現を調べた。飼育開始後 8, 16 日目の CsA 投与群および対照群ラット 20 匹 (各群 10 匹: 5 匹 × 2 実験日) より大腿骨骨髓を RNA 抽出試薬 (TRIZOL®; インビトロジェン, 東京) 中にフラッシュアウトし、ホモジナイザーを用いて細胞を破碎した。以下、通法に従い total RNA を分離し、その一部 (5 μg) を 2 M ホルムアルデヒドを含む 1.2% アガロースゲルを用いた電気泳動で分画した後、エチジウムブロマイドで染色した。次いで、10 倍濃度の SSPE [150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)] を用いたキャピラリーブロッティング法にて Hybond N+ ナイロンメンブレン (Amersham Biosciences) に転写した。アルカリ固定後、プレハイブリダイゼーションを 4 時間行い、骨代謝関連蛋白の cDNA 断片を [<sup>32</sup>P] で標識後 (比活性 1 × 10<sup>6</sup> cpm/μg), 標識 cDNA 断片を用いて 12 時間ハイブリダイゼーションを行った。なお、各 DNA 断片の標識は [<sup>32</sup>P]-dCTP とランダムプライマー DNA ラベリングキット (宝酒造, 京都) を用いて行った。プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションは、50% ホルムアミド, 10× SSPE, 5× Denhardt 液, 0.5% SDS, 200 μg/ml サケ精子 DNA を含む 42℃ の溶液中で行った。その後、メンブレンを 2× SSPE, 0.1% SDS を含む溶液中で室温で 2 回洗浄し、52℃ の同溶液中でさらに 2 回洗浄した後、イメージングプレートを用いて 3 時間オートラジオグラフィーを行った。得られたバンドのデンストメトリック分析は、BAS-2000 II イメージ分析システム (富士フイルム, 東京) を用いて行った。DNA プローブには、PCR 産物を精製したものを用いた。PCR 反応には以下の配列のプライマーを使用した。

OCN 5' プライマー: 5'-ATGAGGACCCTCTCTCTGCTC-3'

OCN 3' プライマー: 5'-GTGGTGCCATAGATGCGCTTG-

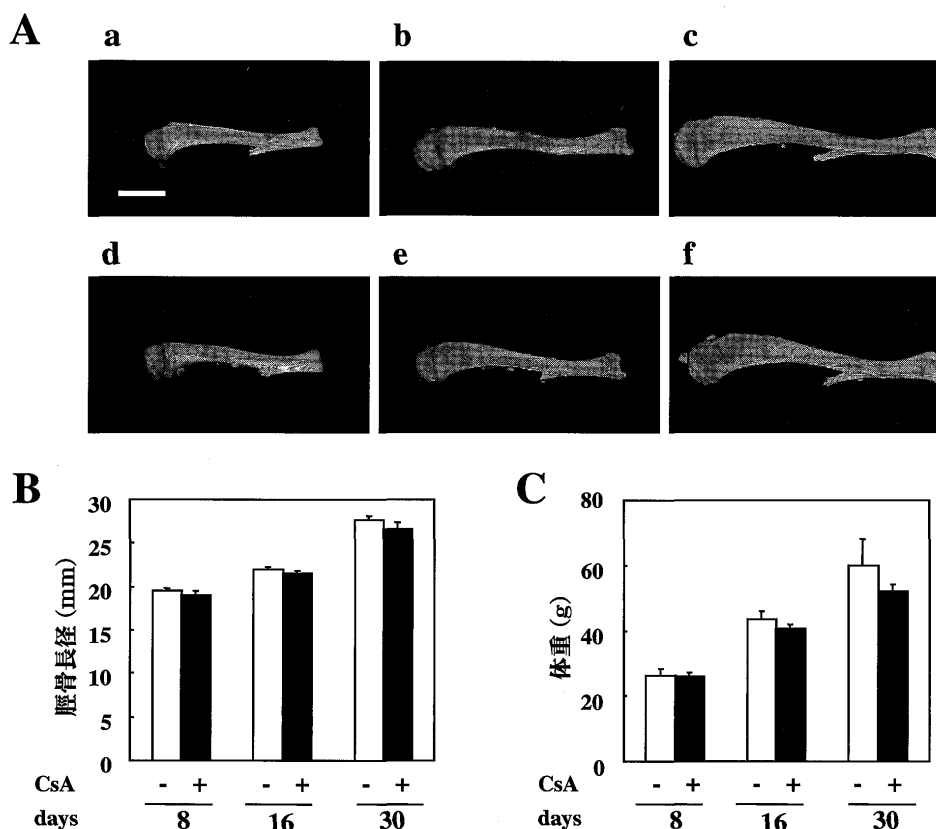


図1 μCTによる長管骨の成長分析

A:飼育開始8日目(a,d),16日目(b,e),30日目(c,f)の脛骨のμCT画像。対照群(a,b,c)とCsA投与群(d,e,f)を示す。(バー:5mm)。B:μCT画像上で測定した,飼育開始8日目,16日目,30日目の脛骨長径を示す。データは平均値±標準偏差である。(n=5) C:飼育開始8日目,16日目,30日目の体重を示す。データは平均値±標準偏差である。(n=5)

3'

OPN 5' プライマー: 5'-ATGGACGATGATGACGACG-3'

OPN 3' プライマー: 5'-GGCTTCTCGGCACTATCGA-3'

カテプシン K 5' プライマー: 5'-CAGTGTGGTTCCTGTTGGG-3'

カテプシン K 3' プライマー: 5'-ACATCTTGGGGAAGCTGGC-3'

なお, 内部標準として用いた glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) のプライマーは, Clontech 社 (Palo Alto, CA, USA) より購入した。定量化された各バンドは G3PDH に対する相対値として表示し, 対照群の値を100とした。

## 6. 統計分析

CsA 投与群および対照群で得られた数値の有意差検定は unpaired t-test に従って行い, 危険率 5 % 以下 ( $p < 0.05$ ) で有意差ありと判定した。

## 結 果

### 1. μCT による 3 次元骨梁構造解析

図1 Aに示すように, 実験期間中, CsA 投与群 (d,

e, f), 対照群 (a, b, c) とともに脛骨の成長が認められ, 30日目の脛骨の長さは8日目の長さとは比べ, 両群とも約1.4倍に伸びていた。また, 実験期間を通じて両群の脛骨の長さに有意差は認められなかった (図1 B)。一方, CsA 投与群の体重も対照群と比較して有意差は認められなかった (図1 C)。以上の結果から CsA は本実験系ラットの成長に影響を与えなかったことが示された。次に, 脛骨近心部の3次元画像を図2 Aに示す。CsA 投与群の脛骨の形態は, 8日目(d)では対照群(a)と比べて変化を認めなかったが, CsA 投与開始後16, 30日目(e, f)では対照群(b, c)に比べて二次海綿骨量が著しく減少し, 骨梁構造の粗造化, 菲薄化が観察された。図2 Bに示すように, 脛骨近心部の3次元骨梁構造解析を行うと, CsA 投与16日以降, 投与群の海綿骨量 [BV/TV (3D)] は対照群に比べて有意に減少した (a)。骨梁幅 (Tb. Th) は CsA 投与16日目に有意な減少が認められ (b), 骨梁間隙 (Tb. Sp) は CsA 投与16日目と30日目で有意に増加した (c)。以上の結果より, ラットに CsA を経口投与すると, 投与16日目以降で脛骨近心部二次海綿骨が吸収されることが3次元画像および画像定量値から示された。

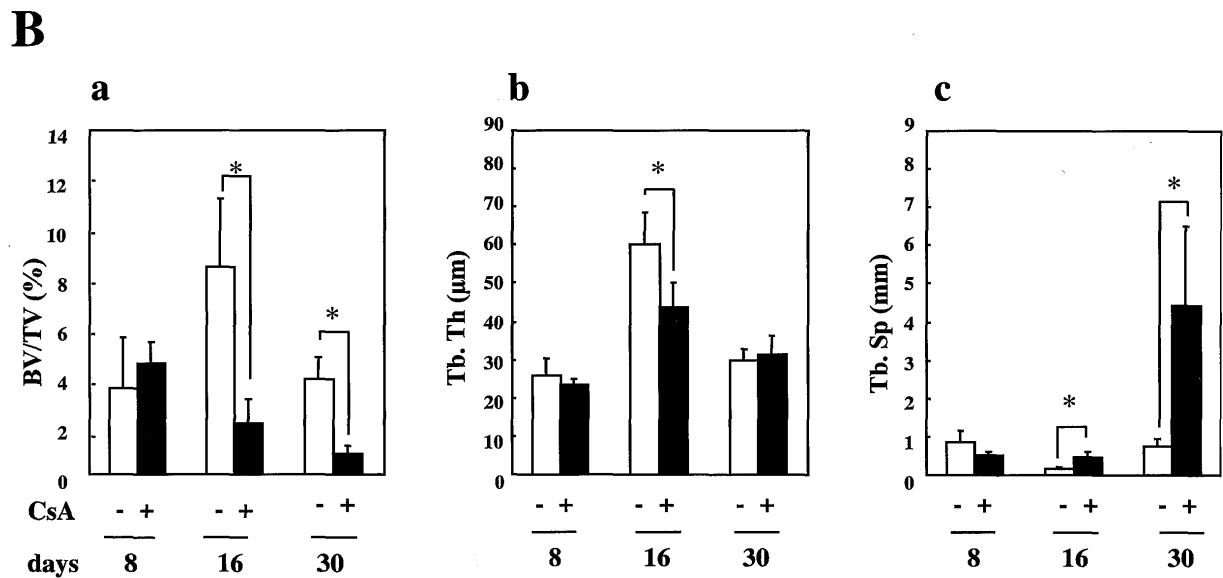
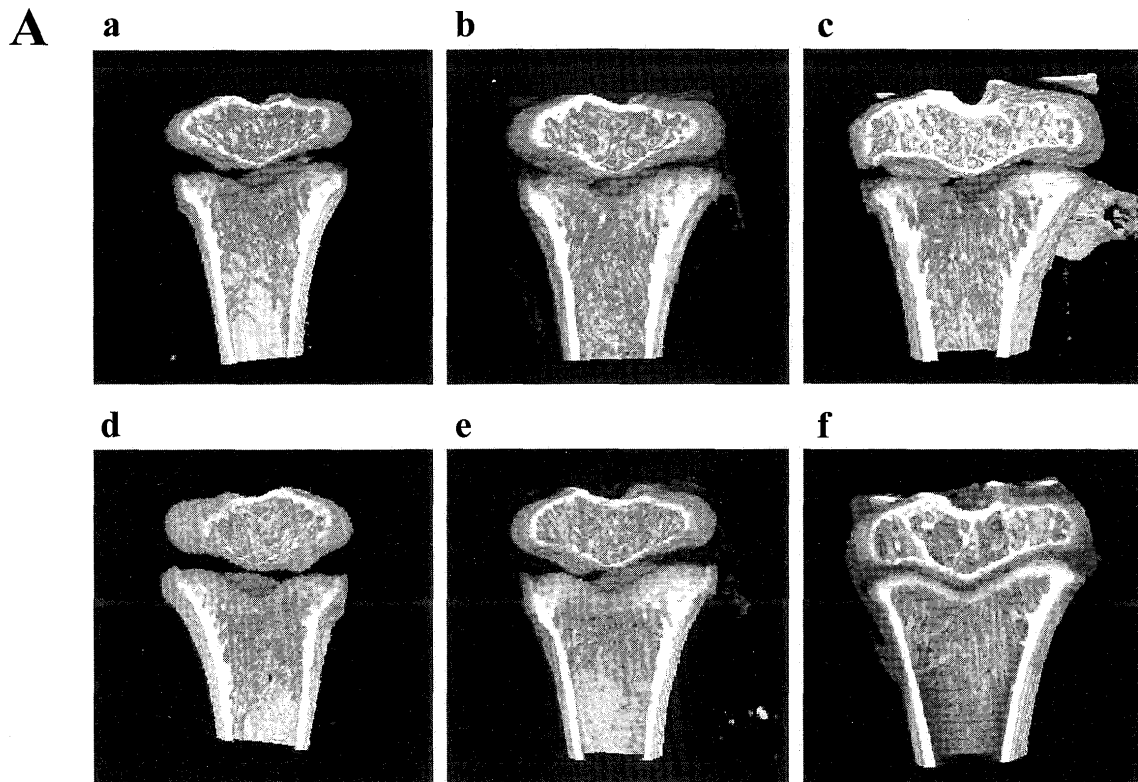


図2  $\mu$ CTによる3次元骨梁構造解析

A: 飼育開始8日目 (a, d), 16日目 (b, e), 30日目 (c, f) の対照群 (a, b, c) と CsA 投与群 (d, e, f) の脛骨近心部の3次元画像。B: 脛骨近心部における3次元構造のパラメータによる定量的解析。海綿骨量: [BV/TV (3D)] (a), 骨梁幅: Tb. Th (b), 骨梁間隙: Tb. Sp (c) を示す。データは平均値±標準偏差である。(n=5, \*p<0.05)

## 2. 骨形態計測

TRAP 染色を行った脱灰薄切切片の光学顕微鏡像の弱拡大像を図3 Aに, 強拡大像を図3 Bにそれぞれ示す。図3 Aに示すように, CsA 投与8日目 (d) では対照群 (a)

と比べて明瞭な差は認められなかったが, CsA 投与16日目以降 (e, f) では, 対照群 (b, c) と比べて二次海綿骨部に明らかな骨量減少が認められた。これらの組織像から骨形態計測を行い定量した結果, 海綿骨量 [BV/TV

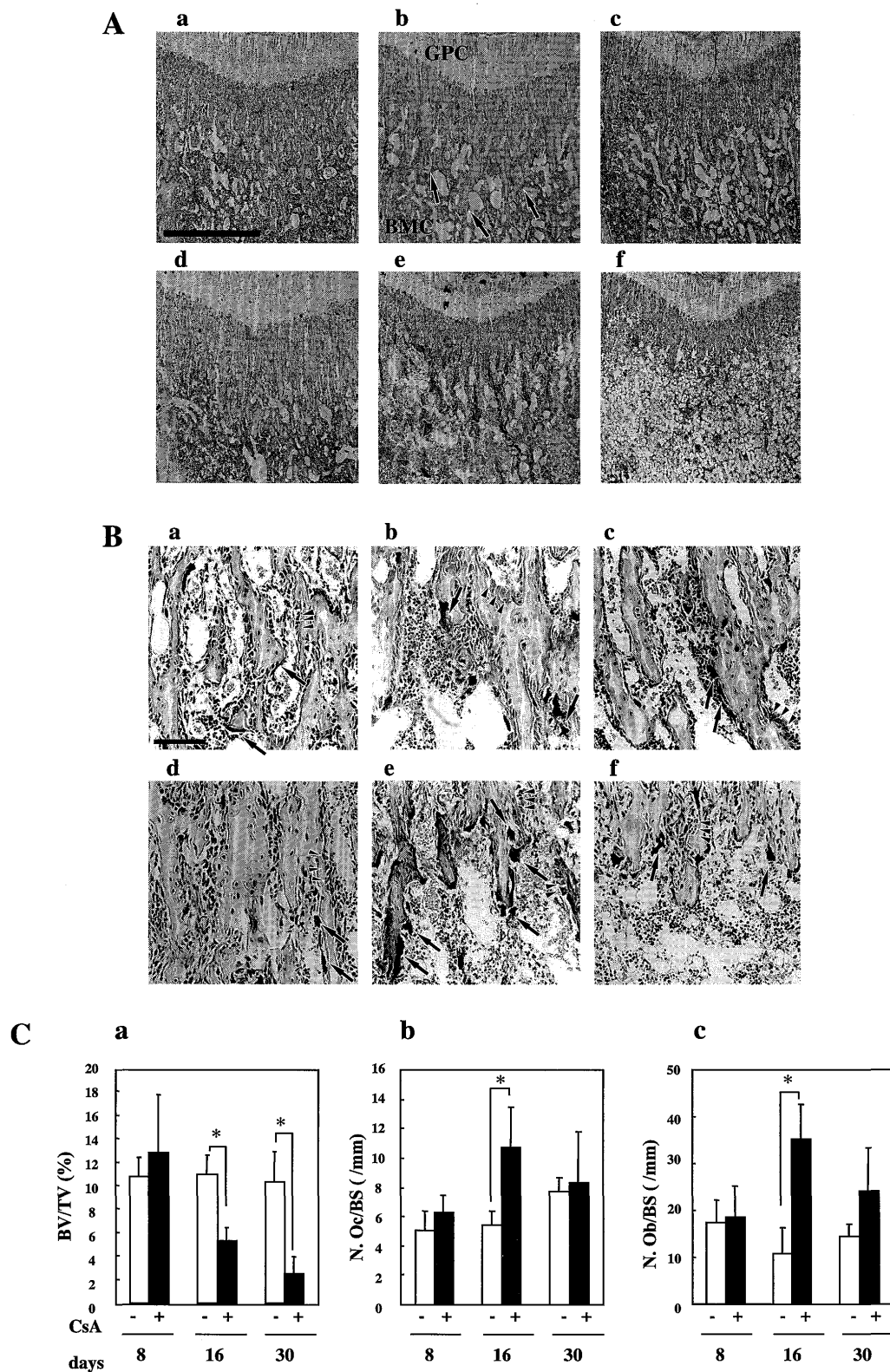


図3 脱灰薄切片の光学顕微鏡像 (TRAP 染色) と骨形態計測

A: 脛骨近心部の弱拡大像。飼育開始8日目 (a, d), 16日目 (b, e), 30日目 (c, f) の対照群 (a, b, c) と CsA 投与群 (d, e, f) を示す。(バー: 1 mm)。GPC: growth plate cartilage (成長軟骨板)。BMC: bone marrow cavity (骨髓腔)。二次海綿骨骨梁 (矢印)。B: 図3 Aの強拡大像を示す。骨梁表面には, TRAP に染まる多核の大きい破骨細胞 (矢印) と規則的に配列する立方体様の骨芽細胞 (矢頭) が存在する (バー: 100  $\mu$ m)。C: 海綿骨量: [BV/TV (2D)] (a), 破骨細胞数: N. Oc/BS (b), 骨芽細胞数: N. Ob/BS (c) を示す。データは平均値 $\pm$ 標準偏差である。(n=5, \*p<0.05)

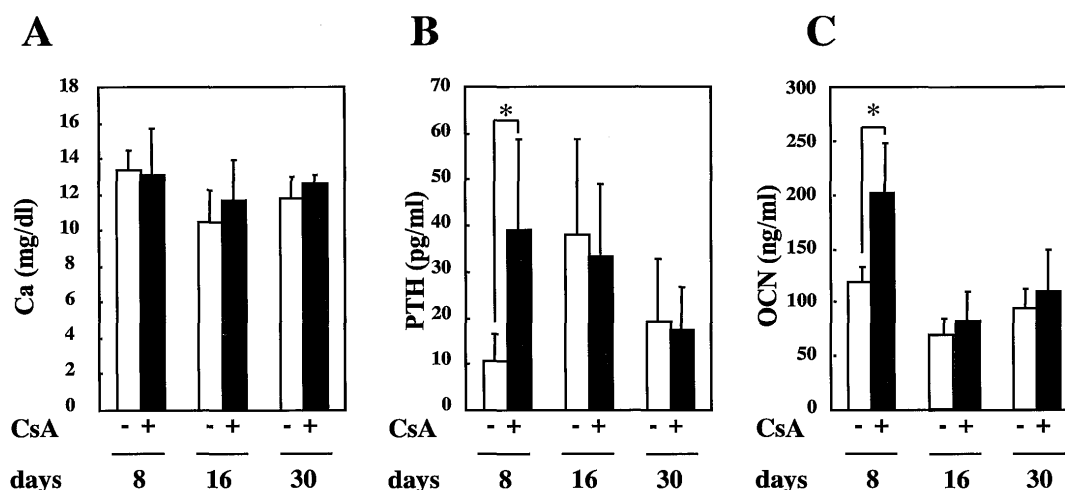


図4 血液生化学分析

飼育開始8日目, 16日目, 30日目の対照群とCsA投与群の血漿カルシウム濃度(A)をMXB法にて, 血漿PTH濃度(B)および血漿OCN濃度(C)をELISA法にて測定した結果を示す。データは平均値±標準偏差である。(n=5, \*p<0.05)

(2D)]はCsA投与16日目で対照群の50%に, 30日目で24%にまで減少していた(図3C-a)。さらに, 強拡大(図3B)で観察すると, 各組織切片像の骨梁表面上にTRAP陽性で多核の破骨細胞と単層の立方形の骨芽細胞の存在が確認でき, その数はCsA投与16日目(e)で著明に認められた。図3C-bに示すように, 破骨細胞数(N. Oc/BS)はCsA投与16日目で対照群の約2倍の値を示していた。しかしながら, CsA投与30日目では破骨細胞数は対照群とほぼ同じ値を示していた。同様の傾向が骨芽細胞数(N. Ob/BS)にも認められ, CsA投与16日目で, その数が対照群の約3.2倍を示しており, 30日目では同様の値を示していた(図3C-c)。

### 3. 血液生化学分析

血漿カルシウム濃度は, 実験期間を通じてCsA投与群, 対照群ともに正常濃度に保たれていた(図4A)。ラットの血漿PTH濃度は, ラットにCsAを投与することにより投与8日目で約4倍にまで上昇しており, 以後その濃度は徐々に減少し, CsA投与16日目および30日目では対照群と同様の値を示していた(図4B)。血漿中のOCN濃度もPTH濃度と同様, CsA投与8日目において対照群に比べて有意に高い値を示しており(約1.7倍), 以後は減少し, CsA投与16日目および30日目では両群の間に有意差を認めなかった(図4C)。

### 4. 大腿骨骨髓細胞におけるOCN, OPN, カテプシンKのmRNA発現

血漿PTH濃度とOCN濃度に有意差の認められたCsA投与8日目と, 差を認めなかった16日目の大腿骨骨髓細胞を用いてOCN, OPNおよびカテプシンKのmRNA発現についてノーザンブロット分析を行った。OCNと

OPNは骨形成時に発現上昇し, カテプシンKは骨吸収時に誘導される蛋白分解酵素である。図5Aに示すように, OCN, OPNおよびカテプシンKのmRNAの各サイズに一致する位置に, 単一バンドの発現がそれぞれ認められた(OCN: 0.6 kb, OPN: 1.5 kb, カテプシンK: 1.3 kb)。OCNのmRNA発現はCsA投与8日目において対照群と比較して約2.5倍の, OPNのmRNA発現については約1.5倍の発現上昇が認められた(図5B)。しかしながらCsA投与16日目では, OCNおよびOPNの発現は対照群と同様のレベルまで低下し, 両群間に有意差は認められなかった。カテプシンKのmRNA発現も骨基質蛋白のmRNA発現と同様の結果を示し, CsA投与8日目では約1.5倍発現が上昇したが, 投与16日目では両群とも同様の値であり有意差は認められなかった。

### 考 察

本研究では, CsA誘発性骨吸収の病態解明を目的として, CsA誘発性歯肉増殖症モデルのラットを用いて長管骨の解析を行い, 特徴的な実験手段として $\mu$ CTを使用した。 $\mu$ CTは微細な骨梁構造を観察するのに有用な機器であり, Ishijimaら<sup>23)</sup>やLaibら<sup>24)</sup>は, OPNノックアウトマウスや閉経後骨粗鬆症モデル(OVXモデル)における骨の形態学的測定に $\mu$ CTを用いて画像解析および定量を行い,  $\mu$ CTが骨代謝研究に優れていることを実証している。本研究では, このラットモデルがCsA誘発性骨吸収の発症メカニズムを解析するための有用な実験系であることを $\mu$ CT分析から得ることができた。加えて, 従来の一般的な手法である組織学的解析を行うとともに, 骨髓細胞での骨代謝関連蛋白のmRNA発現を調べることによって, CsAが骨代謝に及ぼす影響を形態と機能の両面から分析した。

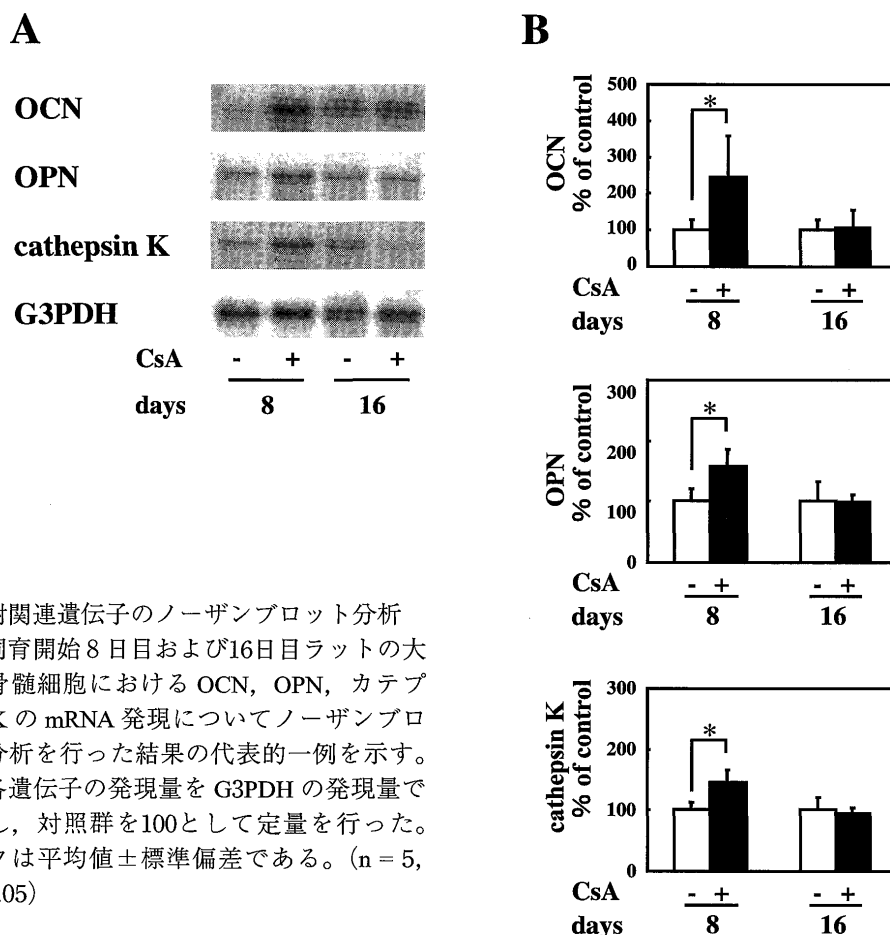


図5 骨代謝関連遺伝子のノーザンブロット分析  
A：飼育開始8日目および16日目ラットの大  
腿骨骨髓細胞における OCN，OPN，カテ  
プシン K の mRNA 発現についてノーザンブ  
ロット分析を行った結果の代表的一例を示す。  
B：各遺伝子の発現量を G3PDH の発現量で  
補正し，対照群を100として定量を行った。  
データは平均値±標準偏差である。(n = 5,  
\*p < 0.05)

臓器移植後の拒絶反応の抑制を目的として CsA を含む免疫抑制剤を投与されている患者では，CsA の服用開始6～12か月の間に著明に骨量が減少し，骨折が増加することが知られている<sup>3)</sup>。一方，ラットに CsA を与えた場合，ヒトと同様に高代謝回転型の骨粗鬆症が発症するとの報告がある<sup>17, 25)</sup>。本研究では CsA 投与後，早期の段階で脛骨に高度の骨吸収が引き起こされることが示された。PTH はヒトの臓器移植後の骨疾患に関連する主要因子の一つであると言われており，Compston ら<sup>26)</sup> は，肝移植後1～2か月の間に血中 PTH レベルが有意に上昇したことを示し，Giannini ら<sup>27)</sup> は，腎移植後に血中 PTH 濃度が上昇したことを報告している。さらに，PTH の有無が CsA 投与による骨疾患に関連するかどうかを検討する研究が副甲状腺摘出ラットを用いて行われているが，CsA 誘発性骨吸収の発症メカニズムにおける PTH の役割は明確にされてはいない<sup>28)</sup>。興味深いことに，低カルシウム食を与えたラット骨吸収モデルでは，骨吸収が生じるよりも非常に早い段階で血清 PTH 濃度が上昇する<sup>22)</sup>。その研究では，低カルシウム食を与えると血中カルシウム濃度が減少した結果，骨組織からカルシウムを動員するために早期の段階で PTH が分泌されたものと考えられ，十分なカルシウムが供給された

後は PTH 濃度が速やかに低下し正常濃度に戻ったと報告されている。本研究では，ラットに CsA を投与した場合，血漿カルシウム濃度は実験期間を通じて CsA 投与群と対照群で差はなく正常濃度に維持されていた。しかし，CsA 投与群の血漿 PTH 濃度は早期（8日目）に約4倍に上昇し，その後，差はなくなった。ラットに CsA を投与すると，腎尿細管のカルシウム結合蛋白であるカルビンディン D28k の合成が低下し，カルシウムの再吸収能が低下し，高カルシウム尿症が発症するとの報告もあり<sup>29, 30)</sup>，CsA 投与ラットではカルビンディン D28k の低下が PTH 作動の誘因になっている可能性がある。このように，本研究においても，血中カルシウム濃度を一定に保つために CsA 投与初期の段階で PTH の分泌が亢進されたものと考えられる。これらの結果から，血漿 PTH 濃度は実際の骨吸収が検出される前に上昇するという点において CsA 誘発性骨粗鬆症の予知因子としての意義があり，臨床的にも有用な指標になりうるのではないかと考えられる。また，ラットとマウスでは，CsA は  $1\alpha$  水酸化酵素の活性を上昇させ，血清中の  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  濃度を増加させるとの報告がある<sup>31)</sup>。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  は PTH の分泌を抑制する作用があり，本研究において CsA 投与16日目以降，血漿 PTH 濃度が正常濃



度へ回復したことは、1,25 (OH) $_2$ D $_3$ による PTH 分泌に対する負の制御が生じた可能性が考えられる。本研究においても1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 濃度を測定することによって PTH との関連を追及することが今後の課題である。また、本研究の対照群において投与開始8日目と16日目において PTH 濃度に大きな差が認められたが、血中 PTH 濃度は同一個体内において変動が大きいことが知られている。Goodman らの報告<sup>32)</sup>によると、ラット実験系では対照群においても実験開始時の血清 PTH 濃度が84.4  $\pm$  13.4 pg/ml であったものが14日後には199.4  $\pm$  38.2 pg/ml にまで上昇しており、同様の現象が本実験系においても観察されたものと推察される。

破骨細胞は血液幹細胞を起源とした骨髄中に存在する前駆細胞、骨芽細胞は間葉系幹細胞を起源とした骨髄中に存在する前駆細胞から分化すると考えられ、その分化過程には種々のホルモンやサイトカイン、成長因子などが関与していることが知られている。Holtrop ら<sup>33)</sup>は、ラットに PTH を投与することにより橈骨近心の破骨細胞数が増加したと報告し、ここで動員される破骨細胞は骨髄血球幹細胞由来であることを示唆している。このことから CsA 投与8日目での PTH 濃度の一時的な上昇は骨髄中での破骨細胞の分化誘導へのトリガーとなった可能性が高く、実際16日目の組織切片では破骨細胞が多く出現していた。今回、骨芽細胞の計測には、二次海綿骨梁表面に存在する立方形の細胞を指標としたが、PTH 受容体は立方形の骨芽細胞と、扁平なライニン細胞(骨芽細胞系の休止期の細胞)に存在しているといわれている<sup>34, 35)</sup>。したがって、骨芽細胞数も16日目に増加したという結果は、PTH の一次的な上昇により直接的に造骨細胞系が刺激され、ライニン細胞から骨芽細胞への活性化が起こった可能性もあることを示唆している。これらに同調するように、CsA 投与初期の段階では骨代謝関連蛋白の発現上昇が認められた。OCN は骨組織に特異的に発現し、比較的分化の後期の段階で発現する<sup>36)</sup>。OVX モデルラットでは骨代謝回転が促進されると、OCN の mRNA 発現が上昇する<sup>37)</sup>。本研究において、CsA 投与8日目では OCN の mRNA 発現は上昇したが、16日目(骨芽細胞の数が増加していた時期)になると、その発現上昇は認められなくなった。このことは OCN が骨芽細胞の分化誘導期に必要な蛋白であることを裏付けている。OPN は OCN とともに主要な骨の非コラーゲン性の蛋白の一つである。その機能は多彩であり、RGD 配列を持つことなどから破骨細胞の骨基質への接着に介在したり<sup>38)</sup>、また、破骨細胞のシグナル伝達経路にも関与しており<sup>39)</sup>、破骨細胞の分化調節因子であるとも言われている<sup>40)</sup>。OPN はカルシウムに高い親和性を示すことから、骨のリモデリングや石灰化にも関与する<sup>41)</sup>。OPN の遺伝子発現が破骨細胞と骨芽細胞の活性化にどのように関与しているかは不明な点が多いが、低カルシウム食飼育ラットモデルでは骨代謝回転が促進し

た状態における OPN や OCN の mRNA 発現の上昇が報告されている<sup>22)</sup>。また、ラット胎児頭蓋冠由来細胞培養系においても、石灰化骨様組織が形成される際に OPN や OCN が mRNA および蛋白レベルで発現促進されることが明らかにされている<sup>42, 43)</sup>。今回の研究においても、骨代謝が亢進し、骨形成が進展する際に OCN や OPN の発現が増加したものと考えられた。

カテプシン K は破骨細胞に多く存在するシステインプロテアーゼであり、骨吸収時に骨基質中のコラーゲンなどの分解に関与する。カテプシン K ノックアウトマウスでは大理石骨病が発症し<sup>44)</sup>、一方、過剰発現させると高代謝回転型の骨吸収を発症する<sup>45)</sup>。したがってカテプシン K は骨吸収において主要な働きをもつと考えられており、今回の研究結果においても CsA 投与群では早期に mRNA の発現亢進が認められたことから破骨細胞機能が活性化していることが示唆された。本研究では CsA 投与後8日目では組織学的な変化、すなわち破骨細胞、骨芽細胞の数の変化は認められなかったが、この時点ではすでに骨代謝関連遺伝子の発現上昇が認められたため、PTH の分泌を起点として骨形成能、骨吸収能はともに活性化されていたものと考えられる。また、それ以降の時期は、個々の細胞の骨形成能、骨吸収能は対照群と比べて差を認めなかったが、その数がトータルで増加したために結果として骨形成、骨吸収が亢進されたと考えられる。このように、CsA はラット長管骨において骨代謝を亢進し、その中で骨形成系よりも骨吸収系が優位になった結果、骨吸収が惹起されたものと推察される。正常な骨においては骨形成と骨吸収がバランスの保たれた状態、すなわちカップリングした状態にあるが、そのバランスが崩れた場合には骨量に変化し、骨形成と骨吸収のアンカップリングが起こる<sup>46)</sup>。一般に、骨代謝回転が促進した状態ではカップリング状態は保たれないといわれており、本研究では CsA が高代謝回転型の骨吸収を誘導することが確認された。

以上のように、今回の研究から、CsA を投与すると PTH 分泌が亢進し、破骨細胞、骨芽細胞の分化や機能が上昇するとともに、その結果、骨代謝回転が促進され、骨吸収が骨形成を上回るアンカップリング状態となり、脛骨近心二次海綿骨部に高代謝回転型骨吸収が生じるものと考えられた。

なお、同じ実験系において CsA 投与ラットの下顎歯槽骨を  $\mu$ CT で解析する研究も進行中である。現在までの結果から CsA 投与群では第一臼歯固有歯槽骨の菲薄化、骨量の減少が認められたが、歯槽骨頂の高さは維持されていた。このことは CsA 投与による歯周病発症への影響は少ないが、歯周病発症後の歯周組織破壊の進行に及ぼす影響は大きいことを示唆している。CsA が歯槽骨破壊の増悪因子になるかどうかについては、今回の研究とは別に今後の興味ある課題である。

## 結 論

CsA 投与ラットの長管骨における骨吸収像の実態が3次元的に明らかにされ、骨梁構造の粗造化、菲薄化が確認された。この骨吸収においては、CsA 投与後早期の段階でPTHの分泌亢進が起こり、破骨細胞、骨芽細胞の分化と機能が活性化された結果、骨代謝が促進され、骨吸収が骨形成を上回ったために高代謝回転型の骨吸収が生じたものと考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜った歯周歯内治療学分野 永田俊彦教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御校閲、御助言を戴きました口腔組織学分野 羽地達次教授、口腔顎顔面矯正学分野 森山啓司教授に深謝致します。また、直接御指導と御助言を戴きましたゲノム機能研究センター遺伝子発現分野 片岡正俊助教授、歯周歯内治療学分野 瀬戸浩行博士に厚く御礼申し上げます。最後に数々の御教示と御援助を戴きました歯周歯内治療学分野の諸先生方に深謝致します。

## 文 献

- 1) Shevach EM: The effects of cyclosporin A on the immune system. *Annu Rev Immunol* 3, 397-423 (1985)
- 2) Farthing MJ and Clark ML: Nature of the toxicity of cyclosporin A in the rat. *Biochem Pharmacol* 30, 3311-3316 (1981)
- 3) Rodino MA and Shane E: Osteoporosis after organ transplantation. *Am J Med* 104, 459-469 (1998)
- 4) Epstein S: Post-transplantation bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton. *J Bone Miner Res* 11, 1-7 (1996)
- 5) Daley TD and Wysocki GP: Cyclosporin therapy: its significance to the periodontist. *J Periodontol* 55, 708-712 (1984)
- 6) Bartold PM: Cyclosporin and gingival overgrowth. *J Oral Pathol Med* 16, 463-468 (1987)
- 7) Durieux S, Mercadal L, Orsel P, Dao H, Rioux C, Bernard M, Rozenberg S, Barrou B, Bourgeois P, Deray G and Bagnis CI: Bone mineral density and fracture prevalence in long-term kidney graft recipients. *Transplantation* 74, 496-500 (2002)
- 8) Cueto-Manzano AM, Konel S, Hutchinson AJ, Crowley V, France MW, Freemont AJ, Adams JE, Mawer B and Gokal R: Bone loss in long-term renal transplantation: histopathology and densitometry analysis. *Kidney Int* 55, 2021-2029 (1999)
- 9) Compston JE: Osteoporosis after liver transplantation. *Liver Transpl* 9, 321-330 (2003)
- 10) Meeran K, Hattersley A, Burrin J, Shiner R and Ibbertson K: Oral and inhaled corticosteroids reduce bone

formation as shown by plasma osteocalcin levels. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 333-336 (1995)

- 11) King CS, Weir EC, Gundberg CW, Fox J and Insogna KL: Effects of continuous glucocorticoid infusion on bone metabolism in the rat. *Calcif Tissue Int* 59, 184-191 (1996)
- 12) Movsowitz C, Schlosberg M, Epstein S, Ismail F, Fallon M and Thomas S: Combined treatment with cyclosporin A and cortisone acetate minimizes the adverse bone effects of either agent alone. *J Orthop Res* 8, 635-641 (1990)
- 13) Wilmsink JM, Bras J, Surachno S, van Heyst JL and van der Horst JM: Bone repair in cyclosporin treated renal transplant patients. *Transplant Proc* 21, 1492-1494 (1989)
- 14) Thiebaud D, Krieg MA, Gillard-Berguer D, Jacquet AF, Goy JJ and Burckhardt P: Cyclosporin induces high bone turnover and may contribute to bone loss after heart transplantation. *Eur J Clin Invest* 26, 549-555 (1996)
- 15) Hawkins FG, Leon M, Lopez MB, Valero MA, Larrodera L, Garcia-Garcia I, Loinaz C and Moreno Gonzalez E: Bone loss and turnover in patients with liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 41, 158-161 (1994)
- 16) Stewart PJ, Green OC and Stern PH: Cyclosporin A inhibits calcemic hormone-induced bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 1, 285-291 (1986)
- 17) Movsowitz C, Epstein S, Fallon M, Ismail F and Thomas S: Cyclosporin-A in vivo produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration. *Endocrinology* 123, 2571-2577 (1988)
- 18) Orsel P, Bielakoff J, Modrowski D, Miravet L and de Vernejoul MC: Cyclosporin A induces in vivo inhibition of resorption and stimulation of formation in rat bone. *J Bone Miner Res* 4, 387-391 (1989)
- 19) Klein L, Lemel MS, Wolfe MS and Shaffer J: Cyclosporin A does not affect the absolute rate of cortical bone resorption at the organ level in the growing rat. *Calcif Tissue Int* 55, 295-301 (1994)
- 20) von Wowern N, Klausen B and Kollerup G: Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *J Periodontol* 65, 1134-1138 (1994)
- 21) Kataoka M, Seto H, Wada C, Kido J and Nagata T: Decreased expression of  $\alpha 2$  integrin in fibroblasts isolated from cyclosporin A-induced gingival overgrowth in rats. *J Periodontol Res* 38, 533-537 (2003)
- 22) Seto H, Aoki K, Kasugai S and Ohya K: Trabecular bone turnover, bone marrow cell development, and gene expression of bone matrix proteins after low calcium feeding in rats. *Bone* 25, 687-695 (1999)

- 23) Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt DT, Nifuji A and Noda M: Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res* 17, 661-667 (2002)
- 24) Laib A, Kumer JL, Majumdar S and Lane NE: The temporal changes of trabecular architecture in ovariectomized rats assessed by MicroCT. *Osteoporosis Int* 12, 936-941 (2001)
- 25) Schlosberg M, Movsowitz C, Epstein S, Ismail F, Fallon MD and Thomas S: The effect of cyclosporin A administration and its withdrawal on bone mineral metabolism in the rat. *Endocrinology* 124, 2179-2184 (1989)
- 26) Compston JE, Greer S, Skingle SJ, Stirling DM, Price C, Friend PJ and Alexander G: Early increase in plasma parathyroid hormone levels following liver transplantation. *J Hepatol* 25, 715-718 (1996)
- 27) Giannini S, D'Angelo A, Carraro G, Antonello A, Di Landro D, Marchini F, Plebani M, Zaninotto M, Rigotti P, Sartori L and Crepaldi G: Persistently increased bone turnover and low bone density in long-term survivors to kidney transplantation. *Clin Nephrol* 56, 353-363 (2001)
- 28) Epstein S, Dissanayake IR, Goodman GR, Bowman AR, Zhou H, Ma Y and Jee WS: Effect of the interaction of parathyroid hormone and cyclosporin A on bone mineral metabolism in the rat. *Calcif Tissue Int* 68, 240-247 (2001)
- 29) Yang CW, Kim J, Kim YH, Cha JH, Mim SY, Kim YO, Shin YS, Kim YS and Bang BK: Inhibition of calbindin D28K expression by cyclosporin A in rat kidney: the possible pathogenesis of cyclosporin A-induced hypercalciuria. *J Am Soc Nephrol* 9, 1416-1426 (1998)
- 30) Steiner S, Aicher L, Raymackers J, Meheus L, Esquer-Blasco R, Anderson NL and Cordier A: Cyclosporin A decreases the protein level of the calcium-binding protein calbindin-D 28kDa in rat kidney. *Biochem Pharmacol* 51, 253-258 (1996)
- 31) Stein B, Halloran BP, Reinhardt T, Engstrom GW, Bales CW, Drezner MK, Currie KL, Takizawa M, Adams JS and Epstein S: Cyclosporin-A increases synthesis of 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the rat and mouse. *Endocrinology* 128, 1369-1373 (1991)
- 32) Goodman GR, Dissanayake IR, Bowman AR, Pun S, Ma Y, Jee WSS, Bryer HP and Epstein S: Transforming growth factor- $\beta$  administration modifies cyclosporin A-induced bone loss. *Bone* 28, 583-588 (2001)
- 33) Holtrop ME, King GJ, Cox KA and Reit B: Time-related changes in the ultrastructure of osteoclasts after injection of parathyroid hormone in young rats. *Calcif Tissue Int* 27, 129-135 (1979)
- 34) Barling PM and Bibby NJ: Study of the localization of [<sup>3</sup>H] bovine parathyroid hormone in bone by light microscope autoradiography. *Calcif Tissue Int* 37, 441-446 (1985)
- 35) Irie K and Ozawa H: Immunohistochemical localization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in rat tibiae. *J Bone Miner Metab* 14, 10-14 (1996)
- 36) Rodan GA and Noda M: Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1, 85-98 (1991)
- 37) Salih MA, Liu CC, Arjmandi BH, Kalu DN: Estrogen modulates the mRNA levels for cancellous bone protein of ovariectomized rats. *Bone Miner* 23, 285-299 (1993)
- 38) Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, Mintz KA, Robey PG, Teitelbaum SL and Cheresch DA: Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin  $\alpha v \beta 3$  potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 268, 9901-9907 (1993)
- 39) Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, Teti A, Grano M, Colucci S, Zamboni-Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL, Cheresch D and Hruska KA: Recognition of osteopontin and related peptides by an  $\alpha v \beta 3$  integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* 266, 20369-20374 (1991)
- 40) Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M and Denhardt DT: Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* 13, 1101-1111 (1998)
- 41) Denhardt DT and Guo X: Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7, 1475-1482 (1993)
- 42) Nagata T, Bellows CG, Kasugai S, Butler WT and Sodek J: Biosynthesis of bone proteins [SPP1 (secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture. *Biochem J* 274, 513-520 (1991)
- 43) Kasugai S, Nagata T and Sodek J: Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. *J Cell Physiol* 152, 467-477 (1992)
- 44) Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P and von Figura K: Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13453-13458 (1998)
- 45) Kiviranta R, Morko J, Uusitalo H, Aro HT, Vuorio E

and Rantakokko J: Accelerated turnover of metaphyseal trabecular bone in mice overexpressing cathepsin K. J Bone Miner Res 16, 1444-1452 (2001)

- 46) 福本誠二：“骨粗鬆症の病型と病態生理”. 骨・カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症. 松本俊夫編. 第1版. 東京, 羊土社, 1996, 128-137